

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**MÉTODO PARA SELEÇÃO *IN VITRO* DE
ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia*
PATOGÊNICOS A OVOS DE *Meloidogyne*
enterolobii.**

SILAS DUTRA SILVA

MONOGRAFIA DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Brasília, DF
Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**MÉTODO PARA SELEÇÃO *IN VITRO* DE
ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia*
PATOGÊNICOS A OVOS DE *Meloidogyne*
enterolobii.**

SILAS DUTRA SILVA

**ORIENTADORES: Prof. Dr. LUIZ EDUARDO BASSAY BLUM e
Dr. ROGÉRIO BIAGGIONI LOPES**

**Brasília, DF
Fevereiro de 2013**

**MÉTODO PARA SELEÇÃO *IN VITRO* DE
ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia*
PATOGENICOS A OVOS DE *Meloidogyne*
enterolobii.**

SILAS DUTRA SILVA

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

APROVADO POR:

Luiz Eduardo Bassay Blum
Doutor, Universidade de Brasília – UnB
email: luizblum@unb.br

Rogério Biaggioni Lopes
Doutor, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
email: rogerio.lopes@embrapa.br

Jean Kleber de Abreu Mattos
Doutor, Universidade de Brasília - UnB
email: jkamattos@gmail.com

Brasília, 05 de março de 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Silas Dutra

“MÉTODO PARA SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia* PATOGÊNICOS A OVOS DE *Meloidogyne enterolobii*” Orientação: Luiz Eduardo Bassay Blum, Brasília 2013. 43 páginas.

Monografia de Graduação (G) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Controle Biológico 2. *Pochonia chlamydosporia* 3. *Meloidogyne enterolobii*

I. Blum, L.E.B. II. Dr.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SILVA, S.D. (2013) Método para seleção de isolados de *Pochonia chlamydosporia* patogênicos a ovos de *Meloidogyne enterolobii*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. 43 páginas. Monografia.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: SILAS DUTRA SILVA

Título da Monografia de Conclusão de Curso: MÉTODO PARA SELEÇÃO *IN VITRO* DE ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia* PATOGÊNICOS A OVOS DE *Meloidogyne enterolobii*

Grau: 3º **Ano:** 2012.

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

Dedico este trabalho a minha família: razão da minha vida, minha força e minha inspiração que, com amor, paciência, confiança e sacrifício, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela vida e pelas oportunidades postas em meu caminho.

Ao pesquisador Dr. Rogério Biaggioni Lopes, pela valiosa orientação, pela confiança, apoio, compreensão, ensinamentos, conselhos e pela contribuição inestimável para minha formação como profissional.

Ao professor Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum pelo apoio e auxílio na realização desse trabalho.

Aos meus pais - minha mãe Danusa Dutra pelo amor, pelo exemplo de vida, força e determinação e por estar sempre ao meu lado; meu pai Paulo Roberto da Silva, pelo exemplo de honestidade e profissionalismo, pela amizade, pela confiança e pela paciência; meu segundo pai João Guilherme Berzoti pelos conselhos, pelas brincadeiras e pelo exemplo de competência; e minha segunda mãe Adriana Alves Paiva pelo carinho, pelas conversas, pelo incentivo e pelo apoio.

À minha família – meus avós Ruth, Newton, Neusa, Dulcinéia, Luiz Manuel e Fátima por serem exemplos de vida, idoneidade e por me apresentarem e ensinarem sobre o alicerce principal (Deus); meus primos pelo apoio, paciência e compreensão; meus tios por acreditarem em mim; e minhas irmãs Giovana, Maria Clara e Viviane, simplesmente por existirem na minha vida.

Aos amigos que fiz na Agronomia, pela oportunidade de estudar e aprender ao lado de pessoas que fizeram e fazem a diferença.

Aos meus amigos: Eduardo Baron, Renan Moreira, Murilo Peres, Angela Gorgen, Pollyana Alves, Fernando Fernandes, Renata Vieira, Ana Paula Corguinha, Emanuele Cardoso, Katiana Guedes, Breno Pinheiro (in memoriam), Carolina Boechat, Gabriela Emiliana, Ricardo Galvagni, Mara Rúbia, Jean Guedes, Isadora Nogueira, Angelina Carrilho, Dannielle Migotto, Déborah Mesquita, Carolina Senhorinho, Larissa Gomes, Felipe Cossul, Luisa Nazareno, Felipe Duarte, Patricia Gomes, Gabriela Gomes, Ariane Amaral, Camila Ramos, Juliana Hiromi, Vanessa Mattos, Santiago Gomez, Ana Laura Sara, Aurelie Pintat, Antoine Corpart, José Fernandez, Daniel Giamportoni e Wilson Cesar pela amizade e apoio.

Aos meus colegas de laboratório Daniela, Carielli, Renan, Polly, Irene, João e Fernanda pela ótima convivência, pela ajuda e aprendizado.

Aos meus companheiros e amigos de Embrapa: Daniela, Débora, Saluana, Diogo, Carielli, Renan, Irene, Polly, Karla, João, Vanessa, Jersys, Déborah, Fernanda, Cristina, André, Simone, Lucas, Carla, Magno, Luisa, Mariana, Marina, Marcela, Edriana, Joelma, Fábio, Marcilene, Valdir, Renata e Luciana pelos bons momentos de todos os dias.

A Daniela Aguiar de Souza por tudo: amizade, apoio, confiança, conversas, risadas, brincadeiras, ajudas, festas, cinemas, avaliações em fins de semana, viagens, ensinamentos e aprendizados.

Aos amigos que fiz na UnB: Renata, Murilo, Glauber, Renatinha, Gleyderson, Fernanda, Gabriel, Saad, Celso e Luiz pelos bons momentos.

A todos os professores da graduação, orientadores e supervisores de estágio, pelos ensinamentos e pelo exemplo como profissionais. Em especial aos pesquisadores Dr. Rogério Biaggioni Lopes, Dr. Marcos Faria, Dra. Myrian Tigano e Dra Regina Carneiro por me acolherem e ensinarem os primeiros passos no campo da pesquisa e aos professores Dra. Marina Bilich e Dr. Ernandes Alencar, por me proporcionarem um grande crescimento pessoal, profissional e acadêmico.

A Dra. Regina Carneiro pelo apoio inestimável as pesquisas feitas disponibilizando materiais para os experimentos.

A Embrapa pelos recursos oferecidos à minha formação acadêmica.

E àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigado!

“A vida me ensinou a nunca desistir.
Nem ganhar, nem perder mas procurar evoluir.”
(Chorão - Charlie Brown Jr.)

RESUMO

MÉTODO PARA SELEÇÃO *IN VITRO* DE ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia* PATOGÊNICOS A OVOS DE *Meloidogyne enterolobii*.

Meloidogyne enterolobii foi detectado no Brasil parasitando fruteiras e hortaliças, inclusive porta-enxertos de plantas resistentes à meloidoginose. O impacto negativo dos agrotóxicos tem levado à proibição ou ao uso restrito de alguns nematicidas. O uso de fungos nematófagos é uma estratégia complementar de controle do nematóide. O objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade de isolados de *Pochonia chlamydosporia* (*P. c.*) a ovos de *M. enterolobii* utilizando-se um novo método de seleção *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos em placas de Elisa com 12 poços contendo uma mistura de ágar-água (1,5%) solidificada. Na primeira fase, cada poço recebeu 150 µL de uma suspensão com 580 ovos. A suspensão de ovos foi obtida pela trituração de raízes infestadas de goiabeira em água e hipoclorito de sódio (0,5%) e separação em peneiras. Após secagem da gota, os ovos foram inoculados com 150 µL de uma suspensão contendo 10^6 esporos.mL⁻¹ dos diferentes isolados do fungo. Na segunda etapa, os quatro melhores isolados foram aplicados sobre massas de ovos extraídas diretamente das raízes, utilizando-se o mesmo método acima descrito. As placas foram incubadas a 25°C e UR>95%. A avaliação foi feita após 15 dias, lavando-se os poços individualmente com 3 mL de água destilada e com o auxílio de um bastão de vidro. A contagem do número de J2 que eclodiram em cada tratamento foi feita em câmara de Peters. Os isolados CG1006 e CG1044 de *P. c.* var. *catenulata* e CG1042 e CG1101 de *P. c.* var. *chlamydosporia* proporcionaram reduções na eclosão superiores a 66%, quando aplicados sobre ovos. As reduções na eclosão de J2 foram inferiores quando os mesmos isolados foram aplicados sobre massas. O método proposto mostrou-se prático e adequado para estudos iniciais de seleção, permitindo a avaliação de um grande número de isolados em curto espaço de tempo.

Palavras-chave: Controle biológico, *Pochonia chlamydosporia*, *Meloidogyne enterolobii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Ciclo de vida do <i>Meloidogyne</i> .	18
2	Fases de desenvolvimento de <i>Meloidogyne enterolobii</i> . A) ovo; B) juvenil no ovo (J1); C) juvenil após eclosão (J2); D) ovo vazio.	25
3	Culturas de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em meio BDA após 12 dias de incubação. A) CG1101 – <i>P.c.</i> var <i>chlamydosporia</i> ; B) CG1044 – <i>P.c.</i> var <i>catenulata</i> .	28
4	Placas de Elisa utilizadas nos experimentos com os poços identificados randomicamente.	28
5	Placas de Elisa incubadas sob condições controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e UR>95%), com o datalogger.	29
6	Flutuação da umidade e temperatura durante o período experimental sobre ovos (etapa ovos).	30
7	Juvenil de <i>Meloidogyne enterolobii</i> colonizado por <i>Pochonia chlamydosporia</i> .	33
8	Número médio de juvenis de <i>M. enterolobii</i> obtidos a partir de massas de ovos expostas a isolados de <i>P. chlamydosporia</i> . A) experimento 1; B) experimento 2.	34
9	Ovos de <i>M. enterolobii</i> parasitados por <i>P. chlamydosporia</i> .	34

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Relação de isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> da Coleção de Fungos de Invertebrados utilizados.	26
2	Número de juvenis de <i>Meloidogyne enterolobii</i> encontrados após exposição a diferentes isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i> .	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Nematóides	16
2.2. Taxonomia do gênero <i>Meloidogyne</i>	16
2.3. Ciclo de vida e comportamento do gênero <i>Meloidogyne</i>	17
2.4. Medidas de controle do gênero <i>Meloidogyne</i>	19
2.5. Taxonomia do gênero <i>Pochonia</i>	21
2.6. Ciclo de vida do gênero <i>Pochonia</i>	22
2.7. <i>Pochonia</i> como agente de biocontrole	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Preparação da suspensão de ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	24
3.2. Seleção <i>in vitro</i> de isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i>	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Seleção <i>in vitro</i> de isolados de <i>Pochonia chlamydosporia</i>	31
4.2. Aplicação sobre ovos individualizados	31
4.3. Aplicação sobre massas de ovos	33
5. CONCLUSÕES	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

Meloidogyne por sua ampla disseminação e alta capacidade destrutiva, é considerado o nematóide mais importante na agricultura mundial (CAMPOS *et al.*, 1997). O controle da meloidoginose é extremamente difícil devido principalmente ao amplo espectro de plantas hospedeiras como algodão, feijão, café, soja, além de hortaliças de importância econômica e culturas econômicas diversas (HUTCHINSON *et al.*, 1999). A reprodução em plantas daninhas tem garantido a sobrevivência desses nematóides em áreas cultivadas, mesmo na ausência das culturas econômicas.

Os sintomas de *M. enterolobii* são bastante sérios, culminando com a morte súbita das plantas. Essa espécie também foi detectada no Rio de Janeiro, em áreas nativas de Mata Atlântica (LIMA *et al.*, 2005), sugerindo-se que esse nematóide não tenha sido introduzido no Brasil proveniente de outros países, como havia sido cogitado por ocasião de sua detecção (CARNEIRO *et al.*, 2001). A espécie foi detectada, também, no estado de São Paulo parasitando porta-enxerto de pimentão ‘Silver’ e tomateiros (cv. Andrea e Débora) resistentes a *Meloidogyne* spp. Esse nematóide vem sendo disseminado entre os produtores, e representa uma praga agressiva, que poderá causar prejuízos aos cultivos (CARNEIRO *et al.*, 2006).

Vários métodos de controle foram testados nos últimos anos, como o controle biológico, o uso de nematicidas, genótipos resistentes e pousio, porém sem resultados satisfatórios (EL-BORAI & DUNCAN, 2005). O uso de nematicidas químicos é uma das principais formas de controle dos nematóides. Entretanto, são produtos caros e altamente tóxicos, causando um potencial impacto negativo sobre o ambiente e à saúde humana. Levando à proibição total ou uso restrito de alguns nematicidas.

Considerando a perspectiva de manejo integrado de pragas, principalmente na agricultura orgânica, que visa à manutenção das populações de pragas em nível de equilíbrio, o controle biológico exerce papel importante. Dentre os agentes de controle biológico de nematóides parasitas de plantas, destacam-se os fungos nematoparasitas. Os fungos que parasitam ovos são promissores agentes de controle biológico de *Meloidogyne* spp. devido à facilidade de produção *in vitro*, e à possibilidade de algumas

espécies de colonizar a rizosfera. Os nematóides formadores de galhas depositam seus ovos em massas envoltas por uma substância gelatinosa de constituição lipoproteica, o que facilita a rápida disseminação dos fungos endoparasitas. Esses fungos induzem desordens fisiológicas nos ovos, interrupção no desenvolvimento embriogênico e, em alguns casos, rompimento físico (DACKMAN *et al.*, 1989). Além disso, esses fungos são parasitas facultativos, o que facilita a sua multiplicação e sua sobrevivência no solo após a aplicação.

Entre os fungos endoparasitas, destacam-se como agentes de controle biológico de *Meloidogyne* spp.: *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams e *Purpuricillium lilacinum* (Thom) Samson. O fungo *P. chlamydosporia* tem sido utilizado no manejo integrado de pragas para o controle de nematóides das galhas em cultivos orgânicos de hortaliças em Cuba (HIDALGO-DÍAZ, 2000). Este fungo é um parasita facultativo de ovos de nematóides sedentários formadores de galhas e de cistos e está associado a solos supressivos a nematóides (KERRY *et al.*, 1993). Ademais, tem a habilidade de crescer endofiticamente nas raízes de plantas de importância econômica, sem causar lesões ou afetar negativamente o crescimento das mesmas (MACIÁ-VICENTE *et al.*, 2008; MACIÁ-VICENTE *et al.*, 2009b), o que facilita sua sobrevivência no solo na ausência dos nematóides. Entretanto, esse fungo apresenta uma variabilidade genética intraespecífica, o que demanda uma seleção de isolados com potencial como agentes de controle biológico (KERRY & BOURNE, 2002).

Diferentes isolados cubanos de *P. chlamydosporia* foram avaliados para o controle de *M. incognita*. Desses, foi selecionado o isolado CG1044 da variedade *catenulata* como a mais promissora, por ter reduzido significativamente as infestações de nematóides em sistemas de produção comercial de vegetais em combinação com rotação de culturas (HIDALGO-DÍAZ, 2000; HIDALGO-DÍAZ *et al.*, 2000; ATKINS *et al.*, 2002, 2003). No entanto, *P. chlamydosporia* foi pouco testado em *M. enterolobii*. Arévalo *et al.* (2012a) observaram que o isolado CG1003 de *P. c. var chlamydosporia* obtido de massas de ovos de *M. enterolobii* coletadas em galhas de raízes de goiabeira infectadas mostrou bons resultados na redução do número de ovos desse nematóide em casa de vegetação. No entanto, essa redução não foi suficiente para minimizar o número de galhas e os sintomas do ataque de *M. enterolobii* em plantas de goiaba (CARNEIRO *et al.*, 2011). Em tomateiros, o fungo *P. chlamydosporia* controlou de forma efetiva *M.*

javanica, reduzindo o número de ovos de 56 a 61% e o número de galhas de 36 a 47% (COUTINHO *et al.*, 2009). Esses resultados indicam o potencial de *P. chlamydosporia* para o controle de *M. enterolobii*, desde que sua aplicação seja conduzida em uma estratégia de manejo integrado, isto é, utilizando o fungo e pelo menos mais um método de controle, tal como rotação de culturas com outras hortaliças que reproduzam menos o nematóide, como é o caso da alface (dados não publicados).

O Brasil produz micopesticidas para o controle de certas pragas agrícolas, no entanto, pouco sobre os fungos que visam o controle de nematóides. Adicionalmente, a maioria desses produtos biológicos não é formulada conforme as normas internacionais, e poucos estão oficialmente registrados no Brasil, impossibilitando a fiscalização dos órgãos reguladores e a garantia da qualidade dos produtos comercializados (FARIA & MAGALHÃES, 2001). A produção em larga escala de fungos nematófagos, viabilizando o fornecimento de grandes quantidades do microrganismo, é importante para a evolução desse método de controle no país. Muitos programas de controle biológico com fungos no mundo utilizam a estratégia de inundação, na qual o agente de controle deve estar disponível em grandes quantidades. Mesmo para estratégias inoculativas, que ocorrem com determinada periodicidade, a disponibilidade de um produto microbiano para o agricultor nas épocas mais favoráveis à aplicação é imprescindível. A produção *in vitro* pode ser feita por meio de fermentações líquidas, semi-sólidas ou em sistemas bifásicos, que utilizam as fermentações líquida e sólida em diferentes etapas. Avanços nestes parâmetros são vitais para o desenvolvimento de produtos microbianos à base de fungos visando o uso em programas de controle biológico de nematóides.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui a Coleção de Fungos de Invertebrados - CFI, encontrada no Laboratório de Micologia de Invertebrados - LMI, que tem suas atividades voltadas para o isolamento, identificação, caracterização, conservação, realização de intercâmbio de fungos e avaliação de isolados como potenciais agentes de controle biológico de pragas agrícolas e de vetores de doenças. Entre os isolados presentes podemos encontrar 41 da espécie *Pochonia chlamydosporia* [= *Verticillium chlamydosporium*]. O objetivo do trabalho foi avaliar isolados de *Pochonia chlamydosporia* quanto a eficácia *in vitro* no controle de *Meloidogyne enterolobii* [= *M. mayaguensis*].

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nematóides

Dentre os animais os nematóides estão entre os mais numerosos no planeta, sendo estimados em um milhão de espécies (VIGLIERCHIO, 1991). Muitas espécies de nematóides são importantes na agricultura, umas por causar danos à produção, e outras, de vida livre, por causar um efeito benéfico à mesma. Os nematóides fitoparasitas causam distúrbios do sistema radicular, induzindo a formação de alterações morfológicas e fisiológicas, prejudicando a absorção e translocação de nutrientes e água.

A quantificação de perdas na produção agrícola no Brasil não é precisa, devido principalmente às interações com danos provocados por pragas e outras doenças, condições climáticas adversas, presença de plantas invasoras e inadequação de tratamentos culturais (RITZINGER & FANCELLI, 2006). Os nematóides podem se tornar fator limitante e até chegar a causar perda total em muitas culturas (TIHOHOD, 1993) como feijão, algodão, soja, café e tomate. Em solos agrícolas, o número dos nematóides pode alcançar vinte milhões por metro quadrado (BARRON, 2003). De acordo com Kerry (2000) e Persson & Jansson (1997), os nematóides de plantas são parasitas obrigatórios e estão abundantemente presentes na rizosfera. A identificação de gêneros e espécies de fitonematóides encontrados nos solos tem grande importância para o controle desses patógenos.

2.2. Taxonomia do gênero *Meloidogyne*

As espécies de *Meloidogyne* Goeldi, 1887 constituem uma pequena parte do Filo Nematoda, que compreende os parasitas do homem, de animais, de plantas e nematóides de vida livre, encontrados no solo, em água doce e no mar (MAGGENTI, 1981). O

gênero *Meloidogyne* faz parte da classe Chromadorea, ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (DE LEY & BLAXTER, 2002; KARSSSEN & MOENS, 2006).

2.3. Ciclo de vida e comportamento do gênero *Meloidogyne*

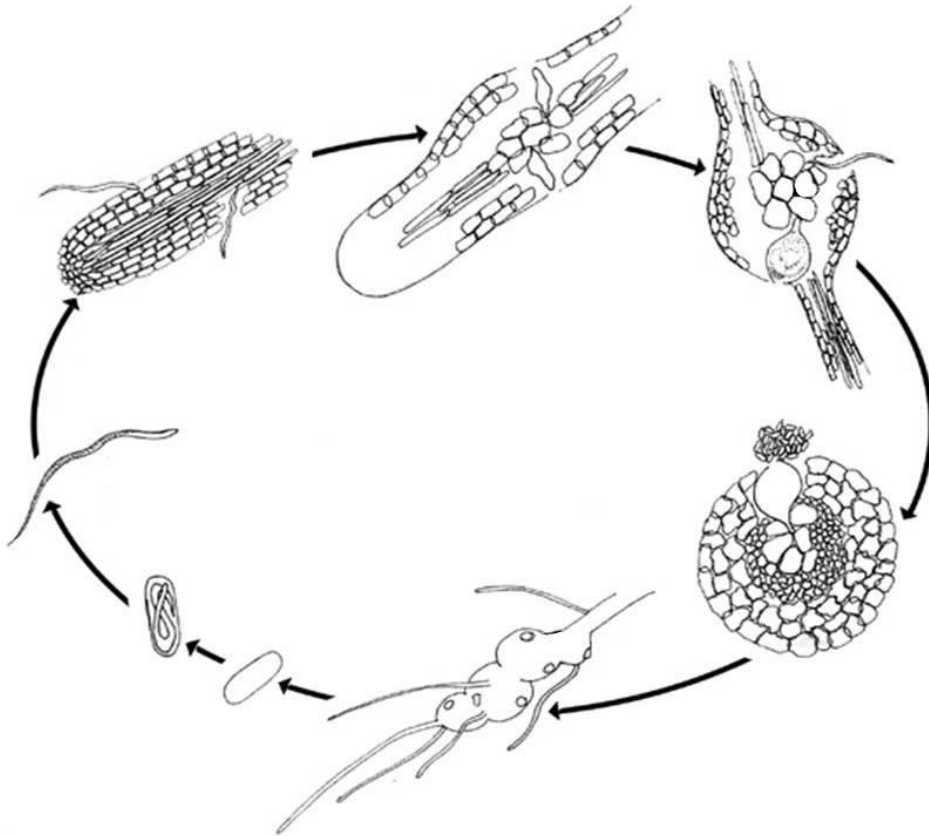


Figura 1. Ciclo de vida do *Meloidogyne*. (FONTE: cortesia V. Breuster)

O ciclo de vida do *Meloidogyne* (Figura 1) se inicia com a deposição de ovos da fêmea em um único local da raiz, formando uma massa de ovos envolta por uma matriz gelatinosa. Cada massa de ovos contém de 400 a 500 ovos, em média. O desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que sofre uma ecdise, ainda no ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2), vermiforme. Nesse estágio, o juvenil móvel infectivo migra através do solo atraído por substâncias

que emanam das plantas, penetrando nas raízes da hospedeira (TAYLOR & SASSER, 1983).

Os J2 movem-se por entre as células dos tecidos da raiz perfurando-as com o estilete, migrando até a zona de alongação, na periferia do cilindro central, estabelecendo-se no parênquima vascular seu sítio de alimentação e iniciando um complexo relacionamento com a planta (TAYLOR & SASSER, 1983). Liberam uma secreção esofagiana, que dá origem às chamadas células gigantes, próximo ao cilindro central da raiz. Ocorre então a segunda ($J2 > J3$), terceira ($J3 > J4$) e quarta ecdises ($J4 > \text{fêmea jovem}$) (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 1991). Logo após a última ecdise, a fêmea jovem começa a se alimentar e permanece ali por toda a sua vida. A partir desse momento começa a ocorrer a hiperplasia e hipertrofia das células comprometidas resultando na formação da galha radicular. Durante esse desenvolvimento pós-embriônico, o sistema reprodutivo se desenvolve e crescem as gônadas funcionais (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 1991).

A mudança de forma nos machos ocorre após a terceira ecdise, durante o quarto estágio juvenil ($J4$). Nesse período ocorre uma metamorfose na qual o corpo se alonga, fazendo com que o macho adulto mude da forma piriforme para a vermiforme (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 1991). O $J4$ está envolvido pelas cutículas do segundo e terceiro estádios e, após a última ecdise, o macho emerge inteiramente desenvolvido (TAYLOR & SASSER, 1983). Os machos adultos não se alimentam e, após a mudança, saem da raiz e movem-se livremente no solo. Não há acasalamento, permanecendo os machos no solo até a morte (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 1991).

O ciclo de vida do nematóide das galhas é muito suscetível à temperatura, umidade, acidez e planta hospedeira. As fêmeas produzem ovos por três semanas, depois cessam a produção, podendo viver por mais um tempo naquele local. Os J2 podem viver de poucos dias a meses e os machos adultos vivem até semanas (TAYLOR & SASSER, 1983).

Meloidogyne enterolobii é uma espécie polífaga. Além da goiabeira parasita algumas olerícolas, plantas ornamentais, fumo, soja, café, mamão, acerola e araçá (MARANHÃO *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2003; CARNEIRO, 2003, BRITO *et al.*, 2007, ALMEIDA & SANTOS, 2011). Populações de *M. enterolobii* têm atacado plantas resistentes a outras espécies de *Meloidogyne*, como o tomate Rossol (gene Mi),

a soja cv. Forest, e a batata doce cv. CDH no Oeste da África (PROT, 1984). Segundo Brito *et al.* (2007), *M. enterolobii* foi detectado em diversas espécies vegetais nos Estados Unidos, incluindo algumas hortaliças. Almeida & Santos (2011) registraram a primeira ocorrência do nematóide em produção de goiaba na região do Triângulo Mineiro. Mostrando o aumento de áreas apresentando a praga.

2.4. Medidas de controle do gênero *Meloidogyne*

O controle do gênero *Meloidogyne* é muito dispendioso, principalmente devido ao fato de que a erradicação é praticamente impossível. O sucesso do controle em áreas infestadas depende de um conjunto de medidas associadas, visando principalmente reduzir o nível populacional e impedir a sua multiplicação. O plantio de mudas certificadas isentas de *Meloidogyne* spp., é a medida de controle mais importante. A utilização de porta-enxertos resistentes ou tolerantes é uma alternativa barata que pode ser adotada pelo agricultor quando detectada a presença do nematóide no local de plantio. A utilização da rotação de culturas, além de melhorar a estrutura do solo, é uma boa opção para áreas altamente infestadas com nematóides. A remoção de plantas daninhas da área também é de grande importância por atuarem como hospedeiras alternativas para os nematóides, além de competir por água, nutrientes e luz com a cultura plantada.

O controle químico de nematóides através do uso de nematicidas (terbufos, carbofuran, aldicarb) apresenta resultados rápidos, porém é antieconômico, pouco eficiente, podem causar sérios problemas à saúde humana e contaminar o meio ambiente (BARELA & CHRISTOFFOLETI, 2006; PATRÍCIO *et al.*, 2002; PIRES *et al.*, 2005). Por esse motivo, a comercialização de parte deles está sendo proibida.

Dentre todos os métodos de controle, considerando a perspectiva de manejo integrado de pragas na agricultura, que visa a manutenção do equilíbrio dos níveis populacionais de pragas, o controle biológico pode exercer um papel importante (FERRAZ & SANTOS, 1995). No caso da meloidoginose podemos encontrar vários agentes biológicos que são utilizados para controlar a praga, como: ácaros de solos,

nematóides predadores (*Seinura* sp.), bactérias (*Pasteuria penetrans* e *Bacillus thuringiensis*), fungos formadores de armadilhas (*Arthrobotrys* spp., *Monacrosporium* spp., *Duddingtonia* spp., *Nematoctonus* spp. e *Tolypocladium* (= *Verticillium*) *balanoides*) e fungos parasitas (*Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* e *Trichoderma* sp.).

Dos microrganismos que atuam no controle de nematóides, os fungos são particularmente atrativos e tem mostrado um ótimo potencial de controle. Eles apresentam estratégias sofisticadas para infectar ou capturar os nematóides, podendo ser divididos em: predadores, endoparasitas, oportunistas (parasitas de ovos e de fêmeas sedentárias) e produtores de metabólitos tóxicos aos nematóides (STIRLING, 1991). Dentre eles, os parasitas de ovos são os que apresentam uma maior perspectiva de utilização por sua facilidade de produção *in vitro* e capacidade de algumas espécies de colonizar a rizosfera sem causar prejuízos à planta (LÓPEZ-LLORCA *et al.*, 2002). Também pela presença da substância gelatinosa que envolve os ovos dos nematóides formadores de galhas, que facilita a rápida disseminação do fungo (CARNEIRO, 1992).

Espécies de *Trichoderma*, fungo de vida livre, são comumente encontrados no solo e rizosfera. São oportunistas e exercem uma simbiose avirulenta com a planta (SHARON *et al.*, 2007). Avaliações vêm sendo feitas usando esse fungo como agente de biocontrole de nematóides fitoparasitas (WINDHAM *et al.*, 1989; REDDY *et al.*, 1996; RAO *et al.*, 1998). A aplicação de *Trichoderma* spp. no pré-plantio pode reduzir significativamente a densidade de J2 nas raízes e no solo, a produção de ovos e a formação de galhas radiculares. Além de apresentar uma alta colonização das raízes até mesmo em solos arenosos, onde o controle por pesticidas sintéticos não é tão efetivo (AFFOKPON *et al.*, 2011).

Fungos dos gêneros *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Phoma* e *Gliocladium* podem ser encontrados parasitando ovos e fêmeas de nematóides fitoparasitas e se desenvolvem saprofiticamente (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1995). Porém, dentre os fungos endoparasitas, as espécies mais conhecidas são pertencentes aos gêneros *Pochonia* e *Purpuliocillium*.

Purpuriocillium lilacinum (= *Paecilomyces lilacinus*) possui ótimos atributos como agente de biocontrole de nematóides (ADIKO, 1984; JATALA, 1986), a espécie

parasita ovos de *Meloidogyne* spp. (DUNN *et al.*, 1982; GODOY *et al.*, 1983) e também pode parasitar galhas jovens e fêmeas de nematóides dos cistos. (GINTIS *et al.*, 1983; JATALA, 1986). Porém, *P. lilacinus* está entre as espécies próximas ao gênero *Paecilomyces* que vem sendo relatadas como patógenos humano (TAKAYASU *et al.*, 1977). O fungo aparenta agir de forma oportunista e geralmente não mostra uma patogenicidade severa (CABANILLAS & BARKER, 1989), mas *Paecilomyces* spp. são patógenos incomuns e podem produzir infecções graves em pacientes imunodeprimidos, e a incidência de infecções em hospedeiros imunocompetentes está aumentando (CAREY *et al.*, 2003).

2.5. Taxonomia do gênero *Pochonia*

As espécies do gênero *Pochonia* (BATISTA & FONSECA, 1965.) constituem uma pequena parte do filo Ascomycota, que compreende o maior filo do reino Fungi com mais de 64.000 espécies. O gênero *Pochonia* faz parte da classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Clavicipitaceae (HUMBER, 2007).

Pochonia é um fungo na fase anamórfica que se reproduz através de duas estruturas reprodutivas: conídios e clamidósporos. Conídios são estruturas unicelulares responsáveis pela rápida disseminação do fungo, enquanto que os clamidósporos são esporos multicelulares, de parede espessa, constituídos de reserva nutritiva que tem como principal função a sobrevivência; ambos são formados assexuadamente. Os clamidósporos são o tipo de propágulo mais efetivo para o estabelecimento do fungo no solo e na rizosfera, pois não requerem nutrientes adicionais (Bourne & Kerry, 1999) e, por possuir a parede celular mais rígida, o clamidósporo tem maior resistência, assegurando a persistência do fungo no solo.

De acordo com Gams (1971, 1988) e revisado por Zare *et al.* (2001), as espécies encontradas dentro do gênero *Pochonia* são: *P. bulbillosa*, *P. chlamydosporia*, *P. gonioides*, *P. microbactrospora*, *P. rubescens* e *P. suchlasporia*. As espécies *P. suchlasporia* e *P. chlamydosporia* possuem duas variedades cada: *suchlasporia* e *catenata*; *chlamydosporia* e *catenulata*, respectivamente. Zare *et al.* (2001) considerou

que observar o arranjo dos conídios (em cadeia ou em cabeça) é indicativo para distinguir as variedades de *P. chlamydosporia* e que os conídios de *P. c. var. catenulata* são mais arredondados que os da var. *chlamydosporia*, que são mais elipsoidais. As variedades de *P. suchlasporia* só podem ser diferenciadas molecularmente.

2.6. Ciclo de vida do gênero *Pochonia*

P. chlamydosporia é uma espécie com grande importância na agricultura. Por ser um parasita facultativo de ovos de nematóides sedentários formadores de galhas e cistos, o fungo vem sendo associado a solos supressivos a nematóides (KERRY *et al.*, 1993) e se mostrando eficiente no controle de *Meloidogyne* spp. (HERNÁNDEZ & HIDALGO-DÍAZ, 2008). Esse fungo, por sua capacidade saprofítica, pode colonizar a rizosfera sem causar lesões ou afetar o desenvolvimento da planta. Característica que facilita sua sobrevivência no solo na ausência de nematóides (DE LEIJ & KERRY, 1991). Mas, apesar do fungo não necessitar do hospedeiro para se desenvolver, Puertas & Hidalgo-Díaz (2007) observaram que *Pochonia* alcança uma maior colonização da rizosfera quando há a presença de nematóides na raiz.

2.7. *Pochonia* como agente de biocontrole

Desde a primeira confirmação do parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre nematóides fitoparasitas (WILLCOX & TRIBE, 1974; KERRY, 1975) estudos vem sendo realizados para avaliar o seu potencial como agente de controle da praga (DE LEIJ & KERRY, 1991; SANKARANARAYANAN *et al.*, 2000; ATKINS *et al.*, 2003; MONTES DE OCA *et al.*, 2005; TZORTZAKAKIS, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2011; AREVALO *et al.*, 2012a, AREVALO *et al.*, 2012b).

P. chlamydosporia induz desordens fisiológicas nos ovos, interrupção no desenvolvimento embriogênico e, em alguns casos, rompimento físico (DACKMAN *et*

al., 1989). Jacobs *et al.* (2003) avaliou o crescimento de isolados dos fungos *P. lilacinum*, *Plectosphaerella cucumerina* e *P. chlamydosporia* em meios sólidos com os tratamentos contendo, separadamente, nematicida (Oxamil) e fungicidas (Pencycuron, Fenpiclonil e Tolclofos-methyl) utilizados para controle de *Rhizoctonia solani*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium bilaii* e *Trichoderma harzianum*. Observou-se que *P. chlamydosporia* foi o isolado menos afetado tendo um desenvolvimento parecido em todos os tratamentos, incluindo a testemunha. Característica favorável para o fungo, pois permite que o agricultor trabalhe em consórcio com outras medidas de controle, sejam elas para patógenos ou pragas.

Experimentos feitos com *Pochonia chlamydosporia*, na cultura de tomate, mostraram que o fungo controlou de forma efetiva *Meloidogyne* sp., reduzindo o número de ovos entre 56 e 61% e o número de galhas entre 36 e 47% (COUTINHO *et al.*, 2009). Viggiano *et al.* (2012) observaram que na produção de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.), a utilização de arroz colonizado por *P. chlamydosporia* em substratos formulado e comercial proporciona um maior desenvolvimento das plantas após o transplântio quando comparado as mudas transplantadas sem o fungo.

Para se utilizar esse fungo de forma comercial, é necessário uma produção em larga escala e para isso, deve-se utilizar um meio de cultivo que compense a produção. Dallemole-Giaretta *et al.* (2011) avaliou diferentes fatores para produção *in vitro* de clamidósporos de *P. chlamydosporia* e observou que o melhor meio de cultivo para produção, dentre os avaliados, é o substrato contendo grãos de arroz.

Hoje já existem produtos comerciais a base de *P. chlamydosporia*, um exemplo é o KlamiC[®] (HERNÁNDEZ & HIDALGO-DÍAZ, 2008). Desenvolvido em Cuba, o bionematicida é produzido através de uma fermentação bifásica onde o ingrediente ativo são clamidósporos de *P. c.* var. *catenulata*. O tempo médio necessário para produção é de 21 dias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparação da suspensão de ovos de *Meloidogyne enterolobii*

A suspensão de ovos de *Meloidogyne enterolobii* foi preparada a partir de raízes de tomate infestadas. Plantas foram inoculadas com 5000 ovos e, tendo alcançado o período mínimo estipulado de 60 dias após a inoculação (DAI), foram utilizadas nos bioensaios. As raízes foram lavadas cuidadosamente, cortadas e trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% por 1 minuto a baixa rotação. Em seguida, o triturado foi passado em peneiras sobrepostas de 20, 100 e 500 mesh. Os resíduos da peneira de 500 mesh foram lavados com água corrente e coletados em béquer. O coletado foi distribuído em tubos de 15 ml, aos quais adicionou-se caulim (aproximadamente uma colher de chá ou 5 gramas) em cada tubo e esses foram centrifugados a 360G/rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, a água sobrenadante foi descartada e uma solução de sacarose a 30% foi adicionada e misturada. A solução foi então centrifugada na mesma velocidade por dois minutos. Em seguida, o sobrenadante foi vertido em peneira de 500 mesh e lavado com água destilada para retirar os resíduos de sacarose. Os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram transferidos para um béquer e contabilizados. Contabilizou-se ovos, J1 e juvenis (J2) (Figura 2), separadamente, com o auxílio de uma câmara de Peter e microscópio óptico e a suspensão final foi padronizada para $3,9 \times 10^3$ ovos/mL.

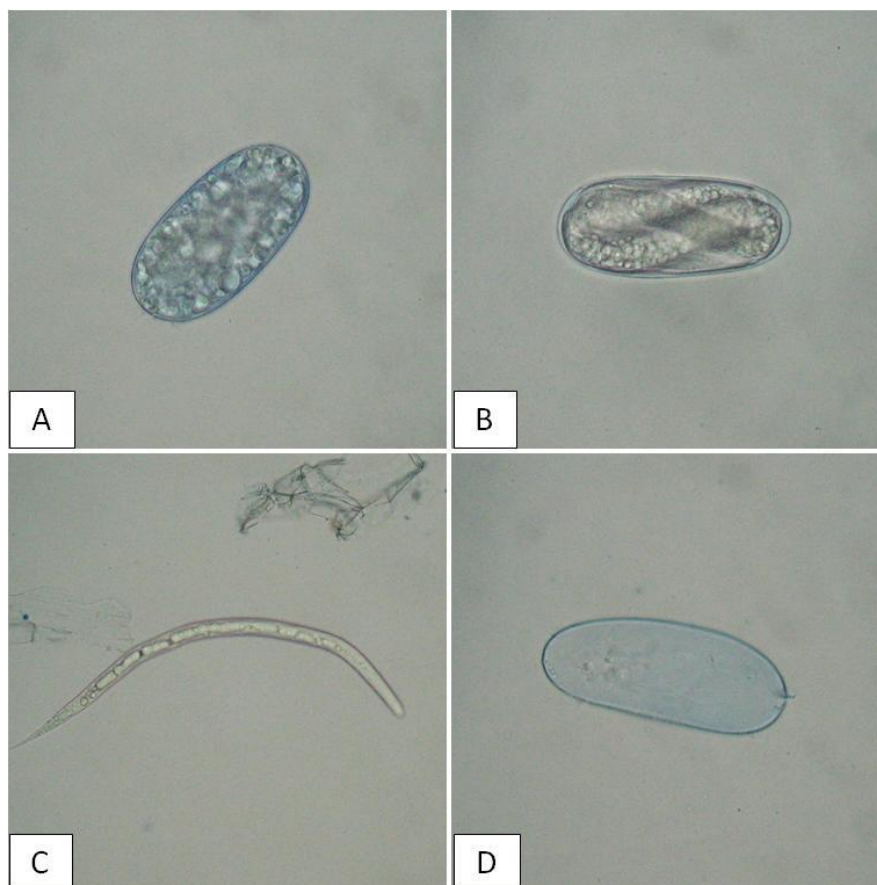


Figura 2. Fases de desenvolvimento de *Meloidogyne enterolobii*. A) ovo; B) juvenil no ovo (J1); C) juvenil após eclosão (J2); D) ovo vazio.

3.2. Seleção *in vitro* de isolados de *Pochonia chlamydosporia*

Foram utilizados 19 isolados de *Pochonia chlamydosporia* pertencentes à Coleção de Fungos de Invertebrados (CFI) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa Cenargen) (Tabela 1). Os isolados armazenados em freezer -80°C foram repicados em placa de Petri contendo meio de cultura BDA + antibiótico (streptomicina) e mantidos em câmara climatizada tipo BOD (25±1°C, 24 horas de esotofase) para crescimento.

Tabela 1. Relação de isolados de *Pochonia chlamydosporia* da CFI utilizados.

Isolado	Espécie	Hospedeiro
---------	---------	------------

CG1003	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1006	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1007	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1039	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematóides
CG1041	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematóides
CG1042	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>Globodera pallida</i>
CG1043	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. incognita</i>
CG1044	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Massas de ovos de nematóides
CG1045	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1046	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1050	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1051	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematóides
CG1052	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematóides
CG1072	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematóides
CG1073	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematóides
CG1074	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>Meloidogyne</i> sp.
CG1075	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>Heterodera avenae</i>
CG1101	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1102	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>

Após 12 dias de incubação, as culturas (Figura 3) foram raspadas com o auxílio de uma espátula de metal e o material transferido para tubos com 10 mL de água destilada estéril (Tween 80 - 0,05%). As suspensões foram agitadas em vortex (1 min), ultrassom (2 min) e vortex (1 min) para homogeneização. Após esse processo, as suspensões foram filtradas com o auxílio de uma gaze para retenção de partículas de meio de cultura e fragmentos de micélio e diluídas para quantificação de esporos

(conídios e clamidósporos). A contagem dos esporos foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico e a suspensão final padronizada para a concentração de 1×10^6 esporos/mL. Os experimentos foram conduzidos em placas de Elisa com 12 poços contendo 3 mL de agar-água (1,5%) solidificado. Os poços foram identificados com os tratamentos de forma randômica (Figura 4). Foram preparadas quatro repetições para cada tratamento, totalizando 80 poços.

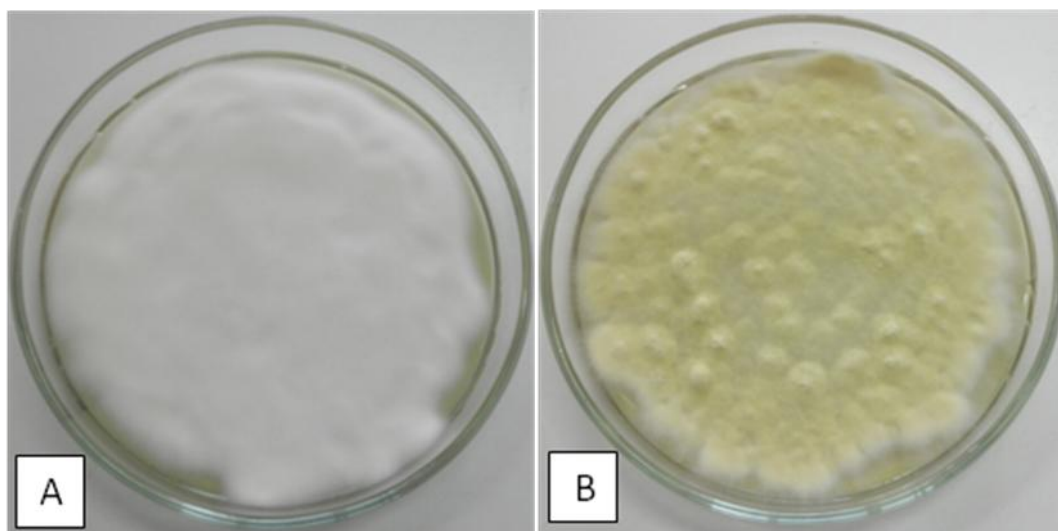


Figura 3. Culturas de *Pochonia chlamydosporia* em meio BDA após 12 dias de incubação. A) CG1101 – *P.c.* var *chlamydosporia*; B) CG1044 – *P.c.* var *catenulata*.



Figura 4. Placas de Elisa utilizadas nos experimentos com os poços identificados randomicamente.

As suspensões foram aplicadas na primeira etapa sobre os ovos extraídos das raízes (item 3.1). Cada poço recebeu 150 μ L da suspensão de ovos, em média 525 ovos. Após secagem do excesso de água, os ovos foram inoculados com 150 μ L da suspensão dos diferentes isolados. Após secagem do excesso de água do inóculo, as placas foram cobertas com um papel filtro umedecido na tampa e incubadas sob condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 24 horas de esotofase e $\text{UR} > 95\%$) (Figura 5). Utilizou-se um datalogger para registro da umidade e temperatura durante todo o período experimental (Figura 6).



Figura 5. Placas de Elisa incubadas sob condições controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} > 95\%$), com o datalogger.

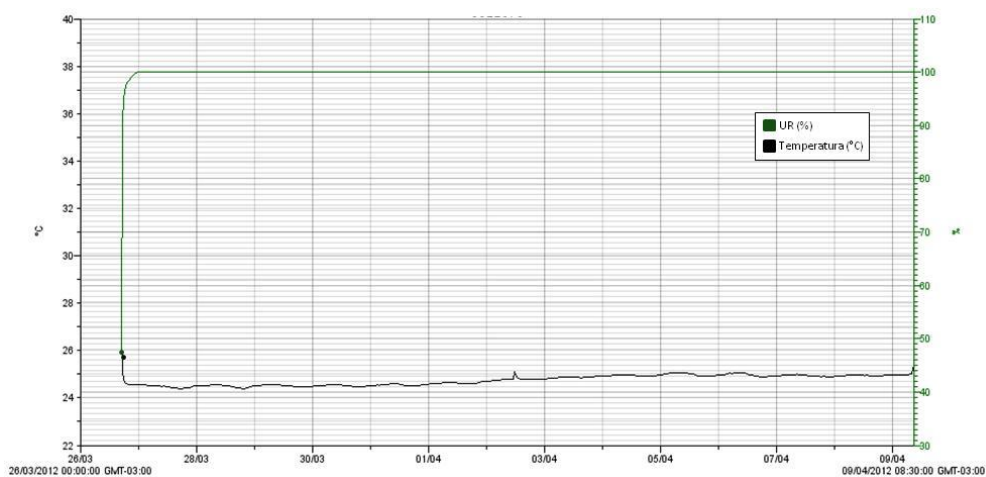


Figura 6. Flutuação da umidade e temperatura durante o período experimental sobre ovos (etapa ovos).

Na segunda etapa, a inoculação do fungo foi realizada sobre massas de ovos (cinco por poço) extraídas diretamente de raízes infestadas, utilizando-se a mesma metodologia descrita acima. Foram selecionados para essa segunda etapa, quatro

isolados dentre os que tiveram os melhores índices de redução de juvenis na etapa anterior.

As avaliações foram feitas 15 dias após a inoculação dos ovos ou massas. Os poços foram lavados individualmente com 3 mL de água destilada com o auxílio de um bastão de vidro de ponta chata. A lavagem foi feita em 3 fases, em cada uma foi utilizado 1 mL de água. Com o material coletado, contabilizou-se em câmara de Peter o número de juvenis (J2) por poço.

Ambos os experimentos (sobre ovos e massas) foram repetidos duas vezes em períodos diferentes. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. No caso do experimento em ovos, os dados foram transformados em $\log(x)$ e as repetições analisadas conjuntamente. Para o experimento em massas de ovos as repetições foram analisadas separadamente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico JMP (JMP Software, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção *in vitro* de isolados de *Pochonia chlamydosporia*

A metodologia desse experimento mostrou-se prática e adequada para avaliação da patogenicidade de *P. chlamydosporia* a ovos do nematóide das galhas *M. enterolobii*. A taxa de recuperação dos estágios do nematóide após 15 dias nos poços foi em média de 82,8% (entre ovos e juvenis). Pode-se observar diferenças entre metodologias de seleção em meio sólido, nesse trabalho a inoculação do fungo foi feita diretamente sobre ovos e massas de ovos. Eapen *et al.* (2005) e Moosavi *et al.* (2010) fizeram de outra forma, aplicaram o fungo no centro de uma placa e distribuíram ovos e massas de ovos, respectivamente, ao redor da área aplicada para que o fungo se desenvolvesse em direção ao hospedeiro e, conseqüentemente, os infectasse. O presente experimento tem como objetivo avaliar a capacidade de infecção do fungo sobre ovos e massas de ovos e essa nova metodologia pode ser mais representativa, pois o patógeno e o hospedeiro ficam em contato direto desde o início, nos mostrando o seu real potencial infectivo em 15 dias.

4.2. Aplicação sobre ovos individualizados

O percentual de eclosão de J2 na testemunha foi de 69,3% (Tabela 2). Apenas os isolados CG1051, CG1043 e CG1007 não se diferenciaram da testemunha. A redução na eclosão de juvenis para os demais isolados variou entre 41,6% e 72,9% mostrando que o fungo causa uma diminuição na porcentagem de eclosão de J2. Os isolados de *P. c. var catenulata* (CG1006 e CG1044) proporcionaram reduções superiores a 70% e estão entre os cinco melhores tratamentos. Dentre os isolados de *P. c. var chlamydosporia*, CG1101 e CG1042 proporcionaram os maiores índices de controle.

Tabela 2. Número de juvenis de *Meloidogyne enterolobii* encontrados após exposição a diferentes isolados de *Pochonia chlamydosporia*.

Tratamentos	Média J2	
Testemunha	332,8 ± 18,7	A
CG1051	282,9 ± 13,7	A B
CG1043	230,3 ± 12,8	A B C
CG1007	214,8 ± 12,1	A B C D
CG1074	194,3 ± 17,1	B C D E
CG1003	193,3 ± 17,5	B C D E F
CG1039	173,3 ± 13,5	B C D E F G
CG1046	164,0 ± 14,4	C D E F G H
CG1102	152,8 ± 18,9	C D E F G H
CG1041	149,0 ± 17,5	C D E F G H
CG1075	132,0 ± 12,7	D E F G H I
CG1050	127,0 ± 10,9	D E F G H I
CG1045	123,5 ± 12,6	E F G H I
CG1072	127,4 ± 17,7	E F G H I
CG1052	97,5 ± 8,5	F G H I
CG1006	110,5 ± 14,7	G H I
CG1073	105,3 ± 16,0	H I
CG1042	105,1 ± 22,2	H I
CG1101	72,8 ± 8,3	I
CG1044	90,3 ± 15,7	I

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (5%).

Foi observado em alguns tratamentos o fungo colonizando juvenis (Figura 7). Porém não se pode afirmar que tais isolados ocasionaram a morte dessa fase de desenvolvimento. O fungo *P. chlamydosporia* é relatado como parasita de ovos de nematóides formadores de galhas (KERRY, 1975; FREIRE & BRIDGE, 1985). Possivelmente, juvenis já mortos pela falta de alimento podem ter sido colonizados de forma saprofítica pelo patógeno.

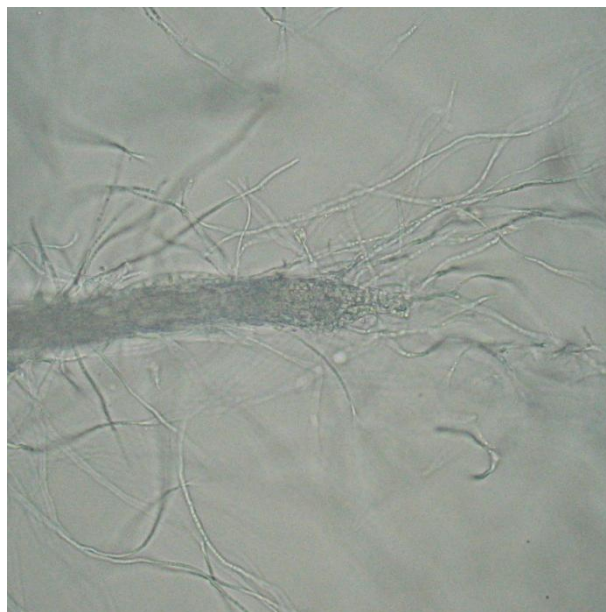


Figura 7. Juvenil de *Meloidogyne enterolobii* colonizado por *Pochonia chlamydosporia*.

4.3. Aplicação sobre massas de ovos

Dentre os melhores isolados na etapa anterior foram selecionados dois da espécie *P. c.* var *catenulata* e dois *P. c.* var *chlamydosporia*. No primeiro experimento somente os isolados CG1006 e CG1044 diferenciaram da testemunha, reduzindo a eclosão dos ovos em 73,1% e 51,3%, respectivamente (Figura 8.A). Apesar dos tratamentos com *P. c.* var *chlamydosporia* terem causado uma diminuição superior a um terço das eclosões, não houve diferença estatística em relação à testemunha. No segundo experimento não foi observado diferença entre os tratamentos (Figura 8.B). Observou-se uma grande diferença na eclosão de ovos das testemunhas dos dois experimentos. Possivelmente, essa variação tenha ocorrido pela diferença no tempo de inoculação das plantas de tomate utilizadas para a produção do inóculo (massas de ovos), aproximadamente um mês entre a inoculação das raízes do primeiro e segundo experimentos. Desta forma, no segundo experimento, provavelmente o número de ovos nas massas estava maior e o desenvolvimento embrionário de grande parte desses ovos mais avançado. Tal fato explica a diferença na média de eclosão entre os experimentos e o efeito nulo dos isolados no segundo experimento, uma vez que a ação infectiva do

fungo é mais eficaz sobre ovos na fase de multiplicação celular e desenvolvimento embrionário (LOPES *et al.*, 2007) (Figura 9).

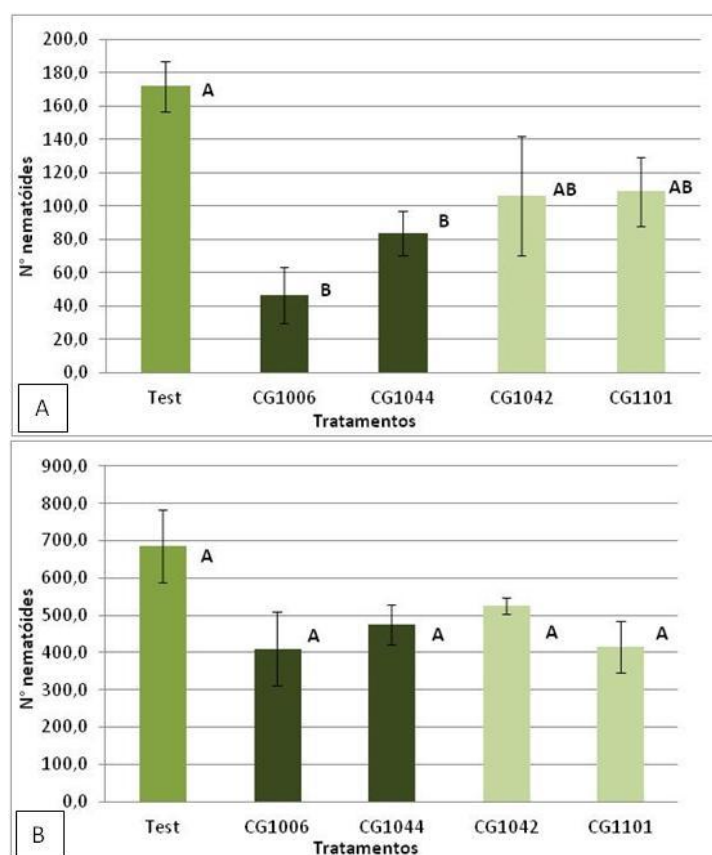


Figura 8. Número médio de juvenis de *M. enterolobii* obtidos a partir de massas de ovos expostas a isolados de *P. chlamydosporia*. A) experimento 1; B) experimento 2.



Figura 9. Ovos de *M. enterolobii* parasitados por *P. chlamydosporia*.

5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que:

- 1) *P. chlamydosporia* é capaz de reduzir eclosão de J2 de *M. enterolobii*.
- 2) A fase de desenvolvimento embrionário dos ovos interfere na taxa de parasitismo e na eficácia do fungo.
- 3) A metodologia proposta permite a avaliação prática e rápida da patogenicidade de um grande número de isolados de *Pochonia* a ovos de *Meloidogyne*.
- 4) A seleção *in vitro* indica o potencial de determinados isolados como agentes de biocontrole, porém, não substituem/excluem testes em condições de campo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devem ser realizadas novas avaliações para complementação do estudo, como: testes sob condição de campo, análise da ação do fungo sobre o juvenil, avaliação de doses, análise comparativa entre *Pochonia chlamydosporia* e outras espécies de fungos ovicidas e análise cooperativa entre *P. chlamydosporia* e fungos nematocidas que atuam sobre o juvenil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIKO, A. (1984). Biological control of *Meloidogyne incognita* with *Paecilomyces lilacinus*. **M.S. thesis**. North Carolina State University, Raleigh.
- AFFOKPON, A.; COYNE, D.L.; HTAY, C.C.; AGBÈDÈ, R.D.; LAWOUIN, L. & COOSEMANS, J. (2011). Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology & Biochemistry**. 43:600-608.
- ALMEIDA, E.J. & SANTOS, J.M. (2011). Ocorrência de *Meloidogyne enterolobii* , no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Biosci. J.** Uberlândia. 27(6):877-878.
- ARÉVALO, J.; SILVA, S.D.; CARNEIRO, M.D.G.; LOPES, R.B.; CARNEIRO R.M.D.G.; TIGANO, M.S. & HIDALGO-DÍAZ, L. (2012a). *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams como potencial agente de control biológico de *Meloidogyne enterolobii* (Yang y Eisenback) en cultivos hortícolas. **Rev. Protección Veg.** 27(2) 123-129.
- ARÉVALO, J.; SILVA, S.D.; CARNEIRO, M.D.G.; LOPES, R.B.; CARNEIRO R.M.D.G.; TIGANO, M.S. & HIDALGO-DÍAZ, L. (2012b). Efecto de la presencia de abono orgánico sobre la actividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams frente a *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback. **Rev. Protección Veg.** 27(3):167-173.
- ATKINS, S.D.; HIDALGO-DÍAZ, L.; CLARK, I.M.; MORTON, C.O.; MONTES DE OCA, N.; GRAY, P.A.Y & KERRY, B.R. (2003). Approaches for monitoring the release of *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, a biological control agent of root-knot nematodes. **Mycological Research**. 107(2):206-212.
- ATKINS, S.D.; HIDALGO-DÍAZ, L.; KALISZ, H.; MAUCHLINE, T.H.; HIRSCH, P.R.Y & KERRY, B.R. (2002). Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**. 59:183-189.
- BARELA, J.F. & CHRISTOFFOLETI, P.J. (2006). Seletividade de herbicidas aplicados em pré-emergência da cultura da cana-de-açúcar (RB 867515) tratada com nematicidas. **Planta Daninha**. Viçosa, MG. 24(2):371-378.
- BARRON, G.L. (2003). Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. **Biodiversity**. Ottawa. 4(1):3-9.
- BATISTA, A.C. & FONSECA, O.M. (1965). *Pochonia humicola* n. gen. e n. sp., uma curiosa entidade fúngica dos solos do Nordeste do Brasil. **Publ. Inst. Micol.** Recife, 462:1-11.

BRITO, J.A.; STANLEY, J.D.; MENDES, M.L.; CETINTAS, R & DICKSON, D.W. (2007). Host status of selected cultivars plants to *Meloidogyne mayaguensis* from Florida. **Nematropica**. 37:65-71.

CABANILLAS, E. & BARKER, K.R. (1989). Impact of *Paecilomyces lilacinus* Inoculum Level and Application Time on Control of *Meloidogyne incognita* on Tomato. **Journal of Nematology**. 21(1):115-120.

CAMPOS, V.P.; SIVAPALAN, P. & GNANAPRAGASAM, N.C. (1997). Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: M. Luc, R.A.S., and J. Bridge eds. (Ed.) **Plant parasitic nematodes in tropical and subtropical agriculture**. Wallingford, UK. CAB International. 387-470p.

CAREY, J.; D'AMICO, R.; SUTTON, D.A. & RINALDI, M.G. (2003). *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immunocompetent patient. **Emerg. Infect. Dis.** 9:1155-1158.

CARNEIRO, R.M.D.G.; HIDALGO-DÍAZ, L.; MARTINS, I.; SILVA, K.F.A.S.; SOUZA, M.G. & TIGANO, M.S. (2011). Effect of nematophagous fungi on reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on guava (*Psidium guajava* L.) plants. **Nematology**. 13(6):721-728.

CARNEIRO, R.M.D.G. (1992). Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 27, p. 113-121.

CARNEIRO, R.M.D.G. (2003). Uma visão mundial sobre a ocorrência e patogenicidade de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e outras culturas. In: **XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia**. p. 22 (resumos).

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; BRAGA, R.S.; ALMEIDA, C.A. & GIORIA, R. (2006). Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de pimentão e tomate resistentes à meloidoginose no Estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**. 30(1):81-86.

CHARCHAR, J.M.; NETO, J.P. & ARAGÃO, F.A.S. (2003). Controle químico de *Meloidogyne* spp. em batata. **Nematologia Brasileira**. 27(1):35-40.

COUTINHO, M.M.; FREITAS, L.G.; DALLEMORE-GIARETTA, R.; NEVES, W.S.; LOPES, E.A. & FERRAZ, S. (2009). Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. **Nematologia Brasileira**. 33(2):169-175.

DACKMAN, C.; CHET, I. & NORDBRING-HERTZ, B. (1989). Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: infection and enzymatic activity. **Microbiology Ecology**. 62:201-208.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; CAIXETA, L.B.; XAVIER, D.M.; FERRAZ, S. & FABRY, C.F.S. (2011). Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciênc. agrotec.** Lavras. 35(2):314-321.

- DE LEIJ, F.A.A.M. & KERRY, B.R. (1991). The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. **Revue de Nématologie**. 14:157–194.
- DE LEY, P. & BLAXTER, M.L. (2002). Systematic position and phylogeny. In: **D.L. Lee (ed.) The Biology of Nematodes**. Taylor and Francis, London, 1-30.
- DUNN, M.T.; SAYRE, R.M.; CARREL, A. & WERGIN, W.P. (1982). Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. **SEM/1982/III**. Scanning Electron Microscopy, Inc. Chicago, IL. 1351- 1357.
- EAPEN, S.J.; BEENA, B. & RAMANA, K.V. (2005). Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.88, 218-225.
- EISENBACK, J.D. & TRIANTAPHYLLOU, H.H. (1991). Root-knot nematode: *Meloidogyne* sp. and races. In: **Nickle, W. R.(ed). Manual of agricultural Nematology**. New York, 191-274.
- EL-BORAI, F.E. & DUNCAN, L.W. (2005) Nematode parasites of subtropical and tropical fruit tree crops. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Eds). **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**, 2. Ed. Wallingford: CABI Publishing, 467-492.
- FARIA, M.R. & MAGALHÃES, B.P. (2001). O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Brasília. 22(4):18-21.
- FERRAZ, S. & M.A. SANTOS. (1995). Controle Biológico de Fitonematóides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS. 3:283-314.
- FREIRE, F.C.O. & BRIDGE, J. (1985): Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne inognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*. **Fitopatol. Bras.** 10:577–596.
- GAMS, W. (1971). Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Gustav Fischer, Stuttgart.
- GAMS, W. (1988). A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. **Netherlands J. Pl. Pathol.** 94:123-148.
- GODOY, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. & MORGAN-JONES, G. (1983). Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse study. **Nematropica**. 13:201-213.
- HIDALGO-DÍAZ, L. (2000). Potencialidades de cepas autóctonas de *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. **Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas**. UNAH-CENSA. 100p.

- HIDALGO-DÍAZ, L.; BOURNE, J.M.; KERRY, B.R.Y. & RODRÍGUEZ, M. (2000). Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: **Isolation and screening**. *Int. J. Pest. Manag.*, 46:277-284.
- HUMBER, R.A. (2007) Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates. *ARSEF. Nota*.
- HUTCHINSON, C.M.; MCGIFFEN JR, M.E.; OHR, H.D.; SIMS, J.J. & BECKER, J.O. (1999). Evaluation of methyl iodide as a soil fumigant for root-knot nematode control in carrot production. **Plant Dis.** 83:33-36.
- JACOBS, H.; GREY, S.N. & CRUMP, D.H. (2003). Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. **Mycol. Res.** 107(1):47-56.
- JATALA, P. (1986). Biological control of plant parasitic nematodes. **Annual Review Phytopathology**. 24:453-489.
- JMP Software, 2007. Version 7.0. SAS Institute, Cary, NC.
- KARSSSEN, G. & MOENS, M. (2006). Root-Knot Nematodes. In: Perry RN, Moens M (Eds). **Plant Nematology**. Cambridge, USA, CABI North American Office. 60-90p.
- KERRY, B.R. (1975). Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. **EPPO Bulletin**. 5:353-361.
- KERRY, B.R. (2000). Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto. 38:423-441.
- KERRY, B.R. & BOURNE, J.M. (2002). A manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, as Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes. **Ed. WPRS/SROP**.
- KERRY, B.R.; KIRKWOOD, I.A.; DE LEIJ, F.A.A.M.; BARBA, J.; LEIDJENS, M.B. & BROOKES, P.C. (1993). Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. **Biocontrol Science Technology**. 3:355-365.
- LIMA, I.M.; DOLINKI, C.M. & SOUZA, R.M. (2003). Dispersão de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeiras de São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros dentre as plantas invasoras e cultivadas. **Nematologia Brasileira**. 27(2):257-258.
- LIMA, I.M.; SOUZA, R.M.; SILVA, C.P. & CARNEIRO, R.M.D.G. (2005). *Meloidogyne* spp. from preserved areas of Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Nematologia Brasileira**. 20:31-38.
- LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P.A.; FREITAS, L.G.; DHINGRA, O.D.; GARDIANO, C.G. & CARVALHO, S.L. (2007). Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. Piracicaba, SP, Brasil. 31(2):20-26.

- LÓPEZ-LLORCA, L. V.; GORDALLO, J.J.; SALINAS, J.; MONFORD, M.L. & LÓPEZ-SERRA, M.L. (2002). Use of a light and Scanning electron microscopy to examine colonization of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. **Micron**. 33:61-67.
- MACIÁ-VICENTE, J.G.; JANSSON, H.B.; MENDGEN, K. & LOPEZ-LLORCA, L.V. (2008). Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Can J. of Microbiol.** 54:6000-6009.
- MACIÁ-VICENTE, J.G.; JANSSON, H.B.; TALBOT, N.J. & LÓPEZ-LLORCA, L.V. (2009a). Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. **New Phytologist**. 182(1):213-228.
- MACIÁ-VICENTE, J.G.; ROSSO, L.C.; CIANCIO, A.; JANSSON, H.B. & LÓPEZ-LLORCA, L.V. (2009b). Colonization of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. **Ann. Appl. Biol.** 155(3):391-401.
- MANZANILLA-LÓPEZ, R.H.; ESTEVES, I.; POWERS, S.J. & KERRY, B.R. (2011). Effects of crop plants on abundance of *Pochonia chlamydosporia* and other fungal parasites of root-knot and potato cyst nematodes. **Annals of Applied Biology**. 159:118–129.
- MAGGENTI, A. (1981). General Nematology. New York: Springer-Verlag.
- MARANHÃO, S.R.V.L.; MOURA, R.M. & PEDROSA, E.M.R. (2001). Reação de indivíduos segregantes de Goiabeira a *Meloidogyne incognita* 1 e *M. mayaguensis*. **Nematologia Brasileira**. 25(2):191-195.
- MONTES DE OCA, N.; ARÉVALO, J.; ACOSTA, N. & HIDALGO, L. (2005). Herramientas para el control de la calidad de la cepa IMI SD:187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex. Barron y Onions) Zare y W. Gams. **Revista de Protección Vegetal**. 20:86–92.
- MOOSAVI, M.R.; ZARE, R.; ZAMANIZADEH, H.R.; FATEMY, S. (2010). Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 104(2):125-133.
- PASTOR, F.J. & GUARRO, J. (2006). Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. **Clin. Microbiol. Infect.** 12:948-960.
- PATRÍCIO, F.C.; RIGITANO, R.L.O.; GOUVÊA, A.V. & FRANCO, A.A. (2002). Toxicidade do inseticida-nematicida aldicarbe às espécies de peixes *Brachydanio rerio* (HAMILTON-BUCHANAN, 1822) e *Orthospinus franciscensis* (EIGENMANN, 1929). **Ciênc. agrotec.**, Lavras. 26(2):385-391.

- PERSSON, C. & JANSSON, H.B. (1997). Colonization of soil by nematophagous fungi. In: **Seminário científico internacional sobre sanidad vegetal**. Ciudad Habana. 127p. (Resúmenes).
- PIRES, D.X.; CALDAS, E.D. & RECENA, M.C.P. (2005). Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro. 21(3):804-814.
- PROT, J.C. (1984). A naturally occurring resistance breaking biotype of *Meloidogyne arenaria* on tomato. Reproduction and pathogenicity on tomato cultivars Roma and Rossol. **Revue de Nématologie**. 7:23-28.
- PUERTAS, A. & HIDALGO-DÍAZ, L. (2007). Influencia de la planta hospedante y su interacción con *Meloidogyne incognita* sobre la efectividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Rev. Protección Veg.** 22(2):104-109.
- RAO, M.S.; REDDY, P.P. & NAGESH, M. (1998). Evaluation of plant based formulations of *Trichoderma harzianum* for the management of *Meloidogyne incognita* on egg plant. **Nematologia Mediterranea**. 26:59–62.
- REDDY, P.P.; RAO, M.S. & NAGESH, M. (1996). Management of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, by integration of *Trichoderma harzianum* with oil cakes. **Nematologia Mediterranea**. 24:265–267.
- RITZINGER, C.H.S. & FANCELLI, M. (2006). Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28 (2):331-338.
- SANKARANARAYANAN, C.; HUSSAINI, S.S. & KUMAR, P.S. (2000). Biological control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White 1919) Chitwood 1949 on tomato by *Verticillium chlamydosporium* Goddard cultured on different substrates. **Journal of Biological Control**. 14:39–43.
- SHARON, E.; CHET, I.; VITERBO, A.; BAR-EYAL, M. NAGAL, H.; SAMUELS, G.J. & SPIEGEL, Y. (2007). Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **Eur J Plant Pathol**. 118:247–258.
- SIDDIQUI, Z.A. & MAHMOOD, I. (1995). Role of plant symbionts in nematode management: a review. **Bioresources Technologi**. 54(3):217–226.
- STIRLING, G.R. (1991). Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects. **CAB International**. Wallingford, UK. 282p.
- TAKAYASU, S.; AKAZI, M. & SHIMIZU, Y. (1977). Cutaneous mycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*. **Archives of Dermatology**. 113:1687-1690.
- TAYLOR, D.T. & SASSER, J.N. (1983). Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (*Meloidogyne* species). **A Coop. Publico of the Depart. Pl Pathology**. N. Carolina St. Univ. and USAID. 111p.
- TIHOHOD, D. (1993). **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP. 372p.

TZORTZAKAKIS, E.A. (2007). The effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in pots. **Russian Journal of Nematology**. 15:89–94.

VIGGIANO, J.R.; FREITAS, L.G. & FERREIRA, P.A.(2012). Resíduo da produção de *Pochonia chlamydosporia* no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. **Pesquisa agropecuária brasileira** [online]. 47(7):983-990.

VIGLIERCHIO, D.R. (1991). The world of nematodes: a fascinating component of the animal kingdom. In: RITZINGER, C. H. S. & FANCELLI, M. 2006. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28:331-338.

WILLCOX, J. & TRIBE, H.T. (1974). Fungal parasitism in cysts of *Heterodera* I. Preliminary investigations. **Transactions of the Brazilian Mycological Society**. 62:585–594.

WINDHAM, G.L.; WINDHAM, M.T. & WILLIAMS, W.P. (1989). Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. **Plant Disease**. 73:493–494.

ZARE, R.; GAMS, W. & EVANS, H.C. (2001). A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. **Nova Hedwigia**. 73:51-86.